DÉTECTION DES SALMONELLES DANS LES ALIMENTS ET L'EAU AU MOYEN DE L'AMPLIFICATION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE (ACP).

1. AVERTISSEMENT ET PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

Les pratiques en matière de santé et sécurité rattachées à cette méthode sont conformes aux directives nationales sur la santé et aux mesures décrites au chapitre 3 du document 01-D-001 intitulé : « Manuel du programme d'assurance qualité du module de microbiologie ». Une attention particulière doit être portée lors de la fabrication du bouillon Rappaport – Vassiliadis Soya (RVS) qui peut être irritant pour les yeux, la peau et les voies respiratoires.

2. INTRODUCTION

Globalement, l'incidence des salmonelloses varie entre 25 et 45 cas par 100 000 habitants. Les salmonelles sont classifiées et identifiées par leur sérotype. Par exemple, il y a une dizaine d'années, le sérotype Typhimurium dominait dans tous les pays occidentaux. Maintenant, en Europe occidentale, le sérotype Enteritidis domine dans la majorité des pays. Au Québec, un phénomène similaire s'installe. La prévalence de ce sérotype a augmenté durant les dernières années et cause des éclosions dans toutes les régions.

Un facteur de risque important pour la *Salmonella* demeure l'alimentation et, plus précisément, la volaille, les œufs, les produits laitiers non pasteurisés, les germes de luzerne et autres germes et certains fruits frais (cantaloup, melon d'eau et autres). Les cas liés aux voyageurs, aux immigrants et aux animaux de compagnie se présentent généralement comme des éclosions limitées.

L'accroissement des infections humaines à salmonelles au cours des 25 dernières années est probablement lié à plusieurs causes telles que :

- Les changements dans l'alimentation et les techniques d'élevage, en particulier celles du poulet avec l'installation de poulaillers de grande superficie;
- Les changements technologiques dans le processus de fabrication des aliments;
- Les modifications dans les méthodes de conservation et de distribution des aliments;
- Les changements démographiques comme l'augmentation du nombre de personnes âgées et des individus immunodéprimés.

3. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détection rapide des *Salmonella sp.* isolées dans les aliments, les ingrédients alimentaires et dans l'eau au moyen d'une technique classique d'enrichissement suivie d'une détection par amplification en chaîne par polymérase (ACP).

4. RÉFÉRENCES NORMATIVES

Cette méthode permet de déterminer s'il y a conformité à l'article 3 de la *Loi sur les produits alimentaires* (P-29). Il existe un critère d'absence pour ce micro-organisme dans les denrées alimentaires ciblées dans le document intitulé : « *Lignes directrices pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire* » (CQIASA/MAPAQ, 2003; http://www.agr.gouv.qc.ca/qasa/cqiasa/pdf/leaa/W_CUMAIRA%20_mars2003.pdf).

5. PRINCIPE

Cette méthode comporte trois étapes distinctes soit, une étape de pré-enrichissement en milieu non sélectif et une seconde d'enrichissement en milieu sélectif suivie d'une ACP.

5.1 Pré-enrichissement en milieu non sélectif

L'aliment est ensemencé dans un milieu nutritif non inhibiteur. Cette étape permet la récupération des bactéries *Salmonella sp.* ayant subies des contraintes physiques ou chimiques (traitement de chaleur, congélation, déshydratation, agents de conservation).

5.2 Enrichissement en milieu sélectif

Les cultures de pré-enrichissement sont ensemencées dans un milieu nutritif contenant des agents inhibiteurs actifs sur les germes qui font concurrence aux *Salmonella sp.*

5.3 Amplification en chaîne par polymérase (ACP)

Après un enrichissement sélectif, l'homogénat est soumis à une amplification génétique qui amplifie une séquence d'ADN spécifique des salmonelles. Les oligonucléotides servant d'amorces pour l'ACP sont hautement spécifiques aux *Salmonella sp.* et n'amplifient pas l'ADN présent chez les autres organismes. Le fragment amplifié d'un poids moléculaire défini par les amorces, est facilement identifié par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

Cette technique est rapide, hautement spécifique et sensible (serait de l'ordre de 1 ufc/25 g d'aliments selon les travaux de Trkov 1999) pour la détection de *Salmonella sp.* à partir d'un homogénat enrichi. Elle détecte la grande majorité des sérotypes qui circulent au Québec.

6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

6.1 Milieux de culture

- Eau peptonée tamponnée (EPT) (Annexe A-1)
- Bouillon Rappaport-Vassiliadis soya (RVS) (Annexe A-2).
- Bouillon au tétrathionate-vert brillant (TBG) (Annexe A-3).

6.2 Solutions et réactifs

- Agarose LE (Boehringer ou équivalent)
- Tampon TAE 10 X (Boehringer 1660690 ou équivalent) (Annexe A-4)

- Bleu de bromophénol (Sigma B-8026 ou équivalent)
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP (dNTP Mix Boehringer 1581295 ou équivalent) (Annexe A-4)
- Bromure d'éthidium (Sigma E-7637 ou équivalent)
- EDTA (Sigma E-5513 ou équivalent)
- $MgCl_2$ 25 mM (QIAGEN ou équivalent)
- Tampon PCR 10 X (QIAGEN ou équivalent)
- Hot Star Taq polymérase 5U/µl (QIAGEN ou équivalent) (Annexe A-4)
- InstaGene Matrix (BioRad ou équivalent)
- Oligonucléotides spécifiques aux salmonelles
- Eau distillée stérile
- Eau de javel 5 % diluée 1:10 (0,5 %)
- Éliminase

Les tampons, l'eau distillée, les embouts de pipettes et autres matériaux qui viennent en contact avec les échantillons ou avec les réactifs de PCR doivent être stérilisés à l'autoclave avant usage afin d'éliminer toute DNase et autres contaminants. Les pipettes et les hottes sont désinfectées avec l'eau de javel 0,5 % et/ou éliminase.

À titre de recommandation ; pour éviter les problèmes de contamination, tous les réactifs devraient être préparés dans une hotte à flux laminaire qui n'a jamais été exposée à *Salmonella* ou aux produits de l'ACP. Il est très important d'analyser les produits de l'ACP dans une autre pièce que celle servant à préparer l'amplification.

7. APPAREILLAGE

7.1 Appareils

- Appareil à dilution automatique – Dilumat 4 (AES Laboratoires)
- Thermocycleur (PTC-200 de MJ Research ou autre);
- Four à micro-ondes ou plaque chauffante;
- Étuve ou bain-marie à (35 ± 1) °C , (43 ± 1) °C et (41,5 ± 1) °C;
- Homogénéisateur de type péristaltique (Stomacher), avec des sacs stériles en plastique;
- Stérilisateur à chaleur humide (autoclave);
- Appareil d'alimentation (BioRad 200/2.0, n° 165-4762 ou équivalent) et peigne à 8 puits (BioRad 170-4333 ou équivalent) ou plus;
- Système de photodocumentation (facultatif, pour les archives photographiques), y compris un appareil photo Polaroïd (portatif ou fixe), un dispositif paralumière et un film Polaroïd 667 ou appareil photonumérique;
- Microcentrifugeuse;
- Agitateur Vortex.

7.2 Matériel et produits spéciaux

- Support de coulage de gel et réservoir à tampon (BioRad 170-4307 ou équivalent);

- Table lumineuse à rayons UV à ondes courtes (transilluminateur) pour visualiser l'ADN coloré dans les gels d'agarose.
- Pipettes sérologiques stériles de 2.0 ml graduées en unités de 0,01 ml;
- Ustensiles de prélèvements stériles;
- Micropipettes de capacité réglable : 0,5-10 µl (pour l'ajout de l'ADN-polymérase Taq); 0,5-10 µl (pour les échantillons de l'ACP); 10-100 µl; 200-1 000 µl;
- Embouts de micropipettes (avec filtre);
- Tubes à centrifuger de 1.5 ml ou l'équivalent;
- Tubes à centrifuger de 500 µl ou l'équivalent (Thin Wall Boehringer);
- Sac pour stomacher;
- Souche témoin de *Salmonella* Matopeni (isolée au laboratoire).

8. ÉCHANTILLONNAGE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons sont analysés le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire. De façon générale, se référer au document 01-D-550 pour la préparation des échantillons.

8.1 Préparation de l'échantillon et pré-enrichissement en milieu non sélectif

8.1.1 Prélever aseptiquement différentes parties du produit à analyser. Si l'échantillon est liquide, l'agiter vigoureusement (en inversant le contenant 25 fois) ou jusqu'à ce que le contenu soit homogène.

8.1.2 Peser 25 g d'aliment, à l'aide d'une balance ou de l'appareil à dilution automatique, et l'ajouter dans un sac en plastique (Stomacher) ou un contenant de verre préalablement taré.

8.1.3 Pour la recherche de *Salmonella* dans l'eau de consommation, un volume minimal de 4 litres doit être filtré sur membrane Millipore HA 0,45 µ. Par la suite, la membrane est déposée dans le bouillon de 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT). Incuber à (35 ± 1) °C pendant 18 à 24 heures.

9. MODE OPÉRATOIRE

9.1 Pré-enrichissement en milieu non sélectif

9.1.1 Préparer une dilution 1:10 de l'aliment en ajoutant aseptiquement, manuellement ou à l'aide de l'appareil à dilution automatique, 225 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) (A-1) à l'unité d'analyse préalablement pesée.

Note 1 : Dans le cas de produits laitiers en poudre, préparer une suspension en déposant 25 g de poudre dans 225 ml d'eau distillée. Ajouter 0,5 ml d'une solution de colorant vert brillant à 1 %. Agiter le tout pour obtenir une suspension uniforme.

Note 2 : Les épices et les assaisonnements sont généralement dissous avec du bouillon nutritif dans un rapport de 1:10. Cependant, certaines épices qui sont bactéricides ou qui absorbent une partie importante de bouillon doivent être dissoutes dans des rapports plus grands (voir le tableau 1 du document 01-M-210).

9.1.2 Mélanger au Stomacher ou à l'homogénéisateur rotatif pendant environ 2 minutes ou jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Éviter tout chauffage excessif de l'homogénat.

9.1.3 En cas de doute, vérifier le pH du mélange en transférant, de façon aseptique, une goutte de suspension sur du papier indicateur de pH. Ajuster, si nécessaire, à un pH entre 6,0 et 7,0 avec du NaOH 1N ou HCl 1N. Incuber ensuite à (35 ± 1) °C pendant 18 à 24 heures.

9.1.4 À chaque série d'échantillons, un témoin positif constitué d'environ 10 g de céréales homogénéisées dans 225 ml d'eau peptonnée tamponnée auxquels une culture de *Salmonella* Matopeni est ajoutée. Cette souche peu présente au Canada permet de détecter rapidement des problèmes de contamination, le cas échéant.

9.2 Enrichissement en milieu sélectif

9.2.1 À l'aide d'une pipette stérile, transférer 0,1 ml de bouillon de pré-enrichissement dans 10 ml de Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) et 1 ml de bouillon à 10 ml de tétrathionate au vert brillant (TBG).

9.2.2 Le tétrathionate est incubé à (43 ± 1) °C pendant 24 ± 2 heures.

9.2.3 Le RVS est incubé à (41,5 °C ± 1) °C pendant 24 ± 2 heures.

9.2.4 Conserver au réfrigérateur les bouillons RVS et TBG pour la recherche des salmonelles par isolement et culture bactérienne suite à des résultats positifs à l'ACP (voir méthode 01-M-210).

9.3 Préparation des gabarits

Après incubation, 1 ml est prélevé à partir du bouillon RSV. Si l'extraction n'est pas effectuée dans les 72 heures, le prélèvement doit être congelé à –20 °C.

Les gabarits d'ADN sont extraits, à partir des enrichissements effectués de la souche témoin (*Salmonella* Matopeni) et des échantillons à l'étude, à l'aide de la trousse InstaGene Matrix™ en appliquant le protocole suivant plutôt que celui du manufacturier uniquement.

9.3.1 Centrifuger l'homogénat 3 minutes à 9 000 x g à 13 000 x g.

9.3.2 Jeter le surnageant et laver le culot avec 1 ml d'eau distillée stérile.

9.3.3 Répéter les étapes 9.3.1 et 9.3.2 deux fois en prenant soin de bien resuspendre le culot au Vortex à chaque fois.

9.3.4 Ajouter 200 µl d'InstaGene Matrix.

9.3.5 Bien mélanger le culot et l'InstaGene Matrix au Vortex pendant 10 secondes ou jusqu'à homogénéité.

9.3.6 Incuber 20 à 30 minutes à 59 °C dans un bain-marie.

9.3.7 Bien mélanger au Vortex pendant 10 secondes.

9.3.8 Placer 8 minutes dans un bain d'eau bouillante.

9.3.9 Refroidir les échantillons en les incubant dans un bain d'eau et glace pendant au moins 5 minutes.

9.3.10 Bien mélanger au Vortex pendant 10 secondes.

9.3.11 Centrifuger 3 minutes à 9 000 x g à 13 000 x g.

9.3.12 Utiliser le surnageant contenant l'ADN pour l'amplification.

9.3.13 Les extraits d'ADN peuvent être conservés à -20 °C, si non utilisés dans un délai de 2 jours à 4 °C.

9.4 Amplification en chaine par polymérase (ACP)

9.4.1 Ajouter 10 µl de la suspension d'ADN à 40 µl de mélange réactionnel (voir point 9) dans un tube à paroi mince de 500 µl et bien agiter. Ajouter à chaque série d'échantillons un blanc où l'ADN est remplacé par de l'eau ainsi qu'un témoin positif ADN extrait. Placer dans le thermocycleur, démarrer le programme de cycle de température tel que décrit au point 9.6.

9.4.2 Lorsque l'amplification est terminée, retirer chaque tube et les conserver à 4 °C jusqu'à l'analyse par électrophorèse. Si l'analyse des résultats de l'amplification (amplicons) ne peut être effectuée dans les 2 jours suivants, il est préférable de placer les tubes à -20 °C.

9.5 Électrophorèse sur gel d'agarose

9.5.1 Préparer le gel d'agarose à 2,0 % (p/v) dans du tampon TAE 1 X (annexe B). Il est possible de dissoudre l'agarose en mélangeant la solution sur une plaque chauffante ou en la plaçant au four à micro-ondes pendant 1 à 2 minutes à puissance élevée. S'assurer que l'agarose est entièrement dissoute (c.-à-d., liquide limpide, exempt de particules en suspension). En cas d'évaporation, ajouter du tampon pour ramener le volume au niveau voulu.

9.5.2 Laisser l'agarose refroidir à 50 °C (environ 10 minutes), ajouter la solution de bromure d'éthidium afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 µg/ml (50 µl d'une solution 1 mg/ml par 100 ml de gel) (Annexe B) puis la verser dans un support à gel dont les deux extrémités ont été scellées avec du ruban gommé. Ajouter le peigne pour la formation des puits et laisser solidifier le gel jusqu'à opacification homogène (environ 30 minutes) à l'abri de la lumière.

9.5.3 Préparer les échantillons pour l'électrophorèse en ajoutant 10 µl de colorant marqueur 5 X au 50 µl d'amplicons.

9.5.4 Une fois le gel d'agarose solidifié, enlever le peigne et le ruban, placer le support à gel dans l'appareil d'électrophorèse et remplir le réservoir avec du tampon TAE 1 X en quantité suffisante pour immerger le gel. Doucement, pipetter le mélange colorant-amplicon (Annexe B) dans les puits du gel submergé (profondeur de 5 mm). Pour chaque rangée de puits, pipetter un ou deux échantillons d'ADN de taille moléculaire déterminée (1 kb plus DNA Ladder ou équivalent) ce qui constitue le standard de référence.

9.5.5 Brancher l'appareil à la source d'alimentation. Appliquer de 100 à 150 volts au gel et laisser fonctionner l'appareil jusqu'à ce que le colorant de repérage arrive à environ 2 cm du bas du gel. Le voltage et le temps est à ajuster selon le type d'appareil. Retirer le gel du support avec précaution.

Note: L'EtBr est un mutagène puissant, utiliser des gants doubles pour le manipuler.

9.5.6 Examiner les bandes d'ADN en exposant le gel à une source de lumière ultraviolette (de courte longueur d'onde) au moyen d'un transilluminateur. Photographier les gels pour faciliter l'analyse et aux fins d'archivage.

9.6 Amorces et programme des cycles de température

9.6.1 Amorces d'ACP

9.6.1.1 Le choix des oligonucléotides servant d'amorces pour la PCR repose sur la séquence de nucléotides publiée par Trkov et al. (1999) et Aabo et al. (1993). Pour l'amplification d'un fragment d'ADN de 429 pb spécifique aux Salmonelles compris dans le fragment JEO 402-1 du chromosome, la séquence de l'amorce requise est la suivante.

Amorce ST11 = 5' AGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA 3'
et
Amorce ST15 = 5' GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTG 3'.

Note : La synthèse des oligonucléotides peut être confiée en sous-traitance à une université locale. En outre, de nombreuses entreprises de biotechnologie offrent des services de synthèse sur commande.

9.6.2 Programme des cycles de températures

9.6.2.1 La Hot Star Taq DNA Polymerase est fournie sous forme inactive ayant aucune activité de polymérisation à température ambiante. Ceci prévient le mauvais appariement des amorces et la formation de " primer dimer " à basse température. La Hot Star Taq DNA Polymérase est activée dans le mélange réactionnel par une étape d'incubation à 95 °C pendant 15 minutes. Par conséquent, le programme des cycles de température doit reposer sur la séquence suivante (Appareil PTC-200 de MJ Research) :

Étape 1	Activation	15 minutes	95 °C
Étape 2	30 cycles de :		
	Dénaturation	30 secondes	95 °C
	Attachement	30 secondes	57 °C
	Extension	45 secondes	72 °C
Étape 3	Élongation finale	10 minutes	72 °C

Note : L'usage de thermocycleurs autres que le modèle précédemment mentionné peut altérer la performance de la PCR; il peut être nécessaire d'optimiser les paramètres des cycles pour des modèles différents. Le programme peut contenir une plage de

72 h à 4 °C à la fin de l'amplification. Ainsi, les amplifications peuvent débuter le vendredi et elles se maintiendront à 4 °C pour la fin de semaine. Idéalement, minimiser le temps où le thermocycleur devra fonctionner à 4 °C puisque la réfrigération diminue la durée de la vie de l'appareil.

10. EXPRESSION DES RÉSULTATS

10.1 Interprétation des résultats

L'amplicon (produit d'ACP) est un fragment d'ADN spécifique de 429 pb de longueur. Par conséquent, une épreuve ACP positive donnera un fragment d'ADN de 429 pb qui apparaîtra sous forme d'une bande nette sur le gel d'agarose coloré à l'EtBr. La taille moléculaire de la bande peut être vérifiée en comparant sa migration à celle de l'ADN de taille moléculaire prédéterminée ayant parcouru la même distance. Normalement, une épreuve ACP négative ne donnera pas de bande visible sur le gel d'agarose coloré à l'EtBr. Dans les cas extrêmement rares où un échantillon a donné des bandes qui ne correspondent pas à un amplicon de 429 pb, (produits d'amplification non spécifiques), l'échantillon est considéré comme étant négatif. Toute bande correspondant à l'amplicon 429 pb produit par le témoin négatif indique une contamination provenant de l'eau distillée stérile, ou du mélange à réaction ACP ou de l'environnement. Toutes les analyses sont alors considérées suspectes et doivent être rejetées; les échantillons doivent être réanalysés avec du nouveau matériel.

10.2 Confirmation des résultats

Tout échantillon montrant une bande distincte d'une longueur de 429 pb est positif. Une confirmation peut alors être réalisée par la recherche de la bactérie présente dans le bouillon d'enrichissement à l'aide d'une méthode de culture bactérienne.

11. ANNEXES

ANNEXE A

MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

Note : Sauf avis contraire, le pH final des milieux peut varier de ± 0,2

A-1 Eau peptonée tamponnée (EPT)

Peptone	10,0	g
Chlorure de sodium	5,0	g
Phosphate disodique (Na_2HPO_4)	3,5	g
Phosphate monopotassique (KH_2PO_4)	1,5	g
Eau distillée	1000,0	ml

Suivre les instructions du fabricant pour la préparation du milieu lorsque l'on emploie une poudre commerciale.

Ajouter les ingrédients à l'eau distillée ou déminéralisée. Mélanger bien pour dissoudre. Distribuer, de façon stérile, en quantité de 225 ml dans des contenants appropriés.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH étant à 7,2 ± 0,2 à 25 °C après la stérilisation.

A-2 Bouillon de tétrathionate au vert brillant (TBG)

A-2.1 Milieu de base

Tryptose ou protéose peptone	5,0 g
Sels biliaires	1,0 g
Carbonate de calcium	10,0 g
Thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$)	30,0 g

Suivre les instructions du fabricant pour la préparation du milieu, lorsque l'on emploie une poudre commerciale.

Dissoudre les ingrédients dans 1000 ml d'eau distillée ou déminéralisée. Bien mélanger et ajuster le pH entre 7,4 et 7,6. Porter à ébullition et laisser refroidir à 50 °C.

A-2.2 Préparation des réactifs :

A-2.2.1 Solution de vert brillant à 1 %

Préparer la solution en diluant 1 g de vert brillant dans 100 ml d'eau distillée.

Stériliser la solution en la laissant bouillir pendant 10 minutes.

Ajouter de façon aseptique 1 ml de la solution de vert brillant à 1000 ml du milieu de base. Répartir le mélange dans des tubes stériles par quantités de 9 ml.

Note : On peut aussi mélanger le vert brillant au milieu de base et les faire bouillir ensemble.

A-2.2.3 Solution d'iode

Iodure de potassium (KI)	25,0 g
Iode (I_2)	30,0 g
Eau distillée	100,0 ml

Dissoudre l'iodure de potassium dans 50 ml d'eau distillée stérile. Ajouter l'iode et agiter jusqu'à dissolution totale. Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée. Conserver la solution d'iode au réfrigérateur, dans une bouteille ambrée. Ne pas chauffer.

Lors de la journée d'utilisation, ajouter dans chaque tube de milieu de base au vert brillant, 0,2 ml de la solution iodée ainsi préparée. Bien mélanger avant l'ensemencement.

A-3 Bouillon Rappaport – Vassiliadis Soya (RVS)

Peptone de soya	4,5	g
Dihydrogénophosphate de potassium	1,26	g
Di-potassium hydrogen phosphate	0,18	g
Chlorure de magnésium, $6H_2O$	13,58	g
Chlorure de sodium	7,2	g
Vert de malachite	0,036	g

Mélanger 26,75 g de Rappaport-Vassiliadis (bouillon) dans un litre d'eau distillée ou déionisée. Chauffer légèrement jusqu'à dissolution complète. Distribuer et stériliser à l'autoclave 15 minutes à 115 °C.

ATTENTION ! Irritant pour les yeux, la peau et les voies respiratoires.

pH final : 5,2 ± 0,2

A-4 Mélange pour l'ACP

Les mélanges à réaction de l'ACP peuvent être préparés en grande quantité et des aliquots de 40 µl sont alors distribués dans des tubes à centrifuger de 500 µl bien à l'avance et stockés à -20 °C jusqu'au moment de leur utilisation (peuvent se conserver jusqu'à un an). Les solutions mères peuvent également être stockées à -20 °C jusqu'au moment de l'emploi. La recette suivante sert à préparer des tubes simples de réactifs, bien que pratique, il soit plus utile de préparer une grande quantité équivalant à 100 amplifications bien à l'avance, puis de préparer des aliquots de 40 µl dans des tubes individuels.

Solutions mères par tube d'amplification

H_20 déminéralisée (stérile)	29,5 µl
Tampon d'ACP 10 X (contient 15 mM $MgCl_2$)	5,0 µl
$MgCl_2$, 25 mM	3,0 µl
Amorce ST 11, 50 µM	0,5 µl
Amorce ST 15, 50 µM	0,5 µl
dNTPs, (dCTP, dATP, dTTP, dGTP), 10 mM	1,0 µl
Hot Star Taq polymérase 5U/µl	0,5 µl
Volume final	40,0 µl

A-4.1 Tampon 10 X pour ACP et solution $MgCl_2$

Le tampon PCR 10 X et la solution de $MgCl_2$ 25 mM sont habituellement fournis à l'achat de Hot Star Taq DNA polymérase 5 U/µl de QIAGEN (cat. n° 203203).

A-4.2 Tampon TAE 50 X

TRIS base	242	g/1
Acide acétique glaciale	57,1	ml/l
EDTA 0,5 M	100	ml/l

Utiliser une concentration 1 X dans les gels et comme tampon d'électrophorèse ou acheter le tampon TAE 10 X (Boehringer n° 1666690)

A-4.3 Colorant de repérage (pour l'électrophorèse) 10 X

Glycérol	50 %
SDS	1 %
EDTA	0,1 M
Bleu de bromophénol	0,1 %

Bien mélanger, utiliser en concentration 5 X.

A-4.4 Solution de nucléotides (dNTP)

On peut se procurer cette solution chez Boehringer Mannheim, en concentration 10 mM, prête à utiliser (PCR Nucléotide Mix 1581295). Des solutions de nucléotides sont aussi disponibles chez d'autres fournisseurs.

ANNEXE B

B-1 Tableau de préparation des gels pour l'électrophorèse

Gel	Agarose	Tampon TAE 1X	Bromure d'éthidium
Petit	0,8 g	40 ml	20 µl
Grand	4,0 g	200 ml	100 µl

B-2 Tableau de préparation et d'injection des échantillons pour l'électrophorèse

Préparation du mélange	Mélange à injecter
Colorant marqueur 5 X 10 µl Amplicons 50 µl	Petit puits : 8 µl Grand puits : 12 µl

B-3 Tableau des répartitions dans les gels d'électrophorèse

Répartition par rangée		
Gel	Standard	Témoin +
Petit	1	1 ou +
Grand	2	2 ou +

12. BIBLIOGRAPHIE

Trkov, M. et al., 1999, Détection of *Salmonella* in food over 30h using enrichment and polymerase chain reaction, Food microbiology, 16 :393-99.

Aabo, S. et al., 1993, Salmonella identification by the polymerase chain reaction, Molecular and Cellular Probes, 7 : 171-178.

DLEAA/MAPAQ. Recherche et identification des *Salmonella* dans les aliments. Méthode 01-M-210.

DLEAA/MAPAQ. Manuel du programme d'assurance qualité. Module de microbiologie. Document 01-D-001.

DLEAA/MAPAQ. Techniques de prélèvements des échantillons pour l'analyse microbiologique des aliments et de l'eau. Document 01-D-540.

DLEAA/MAPAQ. Préparation des échantillons pour l'analyse microbiologique. Document 01-D-550.

13. APPROBATION

Ginette Laperrière, microbiologiste

Christine Duhaime, chargé qualité du module de microbiologie

Pierrette Cardinal, chef du Service de la microbiologie, des toxi-infections alimentaires et plaintes